

УДК 577.113.3:579.25:579.873.7:633.15

Лук'яничук В. В., Поліщук Л. В., Мацелюх Б. П.

ДОСЛІДЖЕННЯ НУКЛЕОТИДНОЇ БУДОВИ СТРЕПТОМІЦЕТНОЇ ПЛАЗМІДИ PSS27

Для *PstI*-фрагменту стрептоміцетної плазмиди *pSS27* (1,5 тпн), що міститься в гібридній плазмиді *pSW49* виявлено значну гомологію з послідовностями ДНК хромосом стрептоміцетів *S. griseus subsp. griseus* NBRC 13350, *S. coelicolor* A3(2) та *S. avermitilis* MA-4680. Визначено гомологію (92 %) нуклеотидної послідовності *PstI*-фрагменту плазмиди *pSS27* з послідовностями хромосомних генів білків споруючої *Streptomyces coelicolor* A3(2) та *S. avermitilis* MA-4680.

Також встановлено значну гомологію (73 %) нуклеотидної послідовності цього фрагменту стрептоміцетної плазмиди з послідовностями генів перенесення інших стрептоміцетних плазмід (*pJV1*, *pSLS* і *pSN22*).

Вступ

Визначення нуклеотидної послідовності ДНК має важливе значення як для дослідження всіх фундаментальних біологічних процесів, так і для встановлення таксономічних зв'язків мікроорганізмів, генно-інженерних та біотехнологічних розробок. На початок 2008 року була визначена повна нуклеотидна послідовність майже 1300 хромосомних ДНК мікроорганізмів, зокрема трьох стрептоміцетних - *S. avermitilis* MA-4680, *S. coelicolor* A3(2) та *S. griseus subsp. griseus* NBRC 13350 [1, 2]. Також велике значення надається встановленню нуклеотидної будови позахромосомних ДНК. Так, на початок 2008 року визначено повну нуклеотидну послідовність більш ніж 1200 плазмід мікроорганізмів, що належать до різних родин. Повну нуклеотидну послідовність встановлено для 22 плазмід стрептоміцетів [1, 2].

На базі даних сіквенс-аналізу плазмідних ДНК виявлено детермінацію ними ряду ферментів (наприклад, ендо- і екзонуклеаз, лігази, полікетидсинтаз I типу, дегідрогеназ), білків мембран та ряду інших метаболітів [1, 2] та встановлено, що ряд плазмід (SCP1, SCP2, SLP2 та деякі інші) кодують білки, що беруть участь в утворенні повітряного міцелію і спор [3, 4, 5].

Враховуючи наведене, метою цієї роботи було встановлення нуклеотидної послідовності 1,5 тпн *PstI*-фрагмента стрептоміцетної плазмиди *pSS27* та визначення детермінованих ним властивостей.

Матеріали та методи дослідження

У роботі досліджували плазмідну ДНК *pSW49* (8,0 тпн) трансформанту *SW49 Escherichia coli* [6].

В експериментах використовували середовища МПА та МПБ, які містили ампіцилін у концентрації 100 мкг/мл.

Плазмідну ДНК з клітин трансформанту отримували за методикою Т. Kieser [7]. Електрофорез плазмідної ДНК проводили в 0,8 % агарозі в ТБЕ-буфері [8].

Визначення нуклеотидних послідовностей проводили на сіквенаторі CEQ2000XL «Beckman». Сіквенс-аналіз проводили з використанням пари праймерів:

F-праймер 5'-GTAAAACGACCGCCAGT-3'

R-праймер 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'.

Результати дослідження

Штам *Streptomyces sp. 27* було виділено зі зразка ґрунту Київської області в 1995 р. У результаті досліджень його фізіологічних та морфологічних властивостей було встановлено, що штам є продуцентом ендонуклеази II типу *Ssp27* та містить плазмиду *pSS27* ($13,7 \pm 0,2$ тпн) [9, 10, 11].

На базі човникового *pWHM4* та колійного *pBluescript II SK(+)* векторів створено банк фрагментів стрептоміцетної плазмиди *pSS27*. Відібрані трансформанти містили гібридні молекули позахромосомної ДНК із фрагментами стрептоміцетної плазмиди *pSS27* від 0,5 тпн до 12,3 тпн [6]. Відомо, що індивідуальні гени становлять лише незначну частину банку клонованих послідовностей. Як встановлено, у складі векторної плазмиди *pWHM4* прокловано, як послідовності ДНК плазмиди *pSS27*, що обмежені сайтами впізнавання рестриктази *PstI* (наприклад, плазмиди *pSW49*), так і такі, що мають один чи більше сайтів рестрикції для певного ферменту всередині проклованого фрагменту (наприклад, плазмиди *pSW51*) [6]. Проведено секвенування фрагментів ДНК плазмиди *pSS27*, які були

включені до складу 11 гібридних плазмід. Розміри визначених нуклеотидних послідовностей стрептоміцетного фрагменту в гібридних плазмідах становили від 352 до 1034 пн [6].

Гібридна плазміда рSW49 (8,0 тпн) містить PstI-фрагмент стрептоміцетної плазмиди рSS27 з молекулярним розміром 1,5 тпн. Розміри визначених нуклеотидних послідовностей цього стрептоміцетного фрагменту становили 638 пн (F-праймер) та 799 пн (R-праймер) (рис. 1, 2).

Порівняння визначеної нуклеотидної послідовності цього PstI-фрагменту плазмиди рSS27 з Інтернет-базами даних GenBank та EMBL, які містять інформацію про визначені нуклеотидні послідовності хромосом і плазмід мікроорганізмів, надали можливість виявити високу тотожність її з рядом генів стрептоміцетів (як хромосомних, так і плазмідних), що детермінують білки з різними функціями [1, 2].

Так, для PstI-фрагменту плазмиди рSS27, що міститься в гібридній плазмиді рSW49 виявлено значну гомологію з послідовностями ДНК хро-

мосом стрептоміцетів *S. griseus subsp. griseus* NBRC 13350, *S. coelicolor* A3(2) та *S. avermitilis* MA-4680 [6].

Встановлено повну гомологію нуклеотидної будови 1,5 тпн PstI-фрагменту стрептоміцетної плазмиди (сіквенс з R-праймера) з послідовностями (довжиною до 150 пн) цих трьох хромосом, що детермінують один з білків дегідрогеназних комплексів. Крім того, незалежно від напрямку аналізу виявлено гомологію (86-92 %) послідовностей цього фрагменту плазмиди рSS27 (довжиною до 220 пн) з генами, що кодують білки, які беруть участь у споруляції *S. coelicolor* A3(2) та *S. avermitilis* MA-4680 відповідно.

Цікаво те, що не виявлено гомології для досліджуваної нуклеотидної послідовності плазмиди рSS27 з хромосомними генами *S. griseus subsp. griseus* NBRC 13350, які детермінують утворення повітряного міцелію та спор, тоді як встановлено значну гомологію з хромосомними ДНК *S. coelicolor* A3(2) та *S. avermitilis* MA-4680.

01	ccccgctcag	tatagccaag	ctgctgcctg	cagatgctgg	ccgacgccat	ggacgtacac
61	ctggcgctgc	ccgatctgcg	caccacgcgc	ggggagatcg	accggctcgg	cgccctgggac
121	ggggccgcggg	ccggtagacc	gctgcaggat	ctccgctgcc	atcgcgacct	cgatggagag
181	cglcacccg	cggcccgcag	glgtlccagl	agtlccgcac	ctcgccgggg	gacgagaact
241	ccggcgaggg	caagagcgac	tgcgacgacg	caccgcccgg	gcggccgggc	ggctgcccctt
301	gttgtgttgc	acggltcacgl	ltggaccggc	gggacgaagc	lgtaccccca	gccccccgac
361	gaaaccgccc	gccggcgccgc	tccacgttt	ggcgaaactg	gttgtccccg	gctgcttccg
421	tlgggtlgtc	gggtlggcca	tlgtlccga	ccctccgttc	lggctlgtcll	gggtcggggg
481	tgcgggactg	gctgttccgg	ccctctgcc	cgccaccgcg	ggcgagccgg	gggaccaagg
541	gggaaccgtt	aaccggatgl	tctlttlcc	tlgccccccc	aaccaccggg	gcttltgttg
601	gtttaccctg	gggtgttggf	ggaacccggg	ttccggggtt	ggggggccaa	acccgggaaa
661	gccaccaacc	cccacatata	cccgccccca	ctccaaacc	ctcgcccaaa	accgggaaaa
721	acccccacca	aaaccaacgc	gcccccaaaa	tccgtatgaa	ggacccccaa	ccaaccccc
781	ccgaaaaccc	cccccccc				

Рис. 1. Нуклеотидна послідовність 1,5 тпн PstI-фрагменту стрептоміцетної плазмиди рSS27 (R-праймер)

01	gaataccggt	acccggggac	ctctagagtc	acctgcagac	ggagatcctg	tccggcgggg
61	atgtatcgt	glggtlctcc	gaccggaagt	cgltccagga	ctlccggccg	ctgtlgtccc
121	cttacgactg	ggcagtggag	ggcagtggag	ctacggagge	catggtggag	gccatcaacg
181	cagccatccc	cgcgccgac	cggtlgtcgc	gtgcgcacgc	ctaccggcag	lgggtlccgg
241	acgtgcecca	gcagcagacc	agccccgggc	actctgccg	gcaggacgga	cgcgcgtgcg
301	gctgcgctgg	catgccgttc	ctcctggcat	ggatcgagga	ggggccggaa	caccctccgg
361	gccactctag	tggaccacgc	gggtgccacc	gggcaattct	acccagggaa	ggtaccgggg
421	ttggcgccg	ggcattcggt	ccctcggtta	attcttccc	gccaaccggg	cccttttccc
481	aaccaacata	attccacact	cccactttct	gccctctggt	aagccctgga	ttccaatgcg
541	ggaaaaagac	gggttttccc	ccccataaaa	cccttaatt	ctaaatcccc	cggtaaaagg
601	agagcccgcc	agagaaacca	gttggggcaa	cccccggt		

Рис. 2. Нуклеотидна послідовність 1,5 тпн PstI-фрагменту стрептоміцетної плазмиди рSS27 (F-праймер)

З даних літератури відомо, що у штама *S. coelicolor* A3(2) є білки, які забезпечують утворення повітряного міцелію та спор, які детермінуються генами, локалізованими на хромосомі і плазмідах SCP1 та SCP2 [1, 2, 3, 4]. Необхідно підкреслити, що не виявлено гомології нуклеотидної будови у вищезгаданих генів. Цікавим є той факт, що нами виявлено гомологію нуклеотидної послідовності плазмиди pSS27 з локалізованими на хромосомі *S. coelicolor* A3(2) *traA1* і *traB1* генами, які детермінують білки споруючії.

У літературі є повідомлення про гомологічність нуклеотидних послідовностей плазмідних і хромосомних генів клітини-господаря. Гени можуть детермінувати властивості, важливі для мікроорганізму. Наприклад, у штаму *S. cattleya* знайдено плазмиду, яка містить ген аргінінсуцинат синтетази, що гібридується з аналогічними генами стрептоміцетів [12]. Зі штаму *S. rimosus* SRP2 було виділено плазмиду SRP2¹, що містила ген стійкості до окситетрацикліну, послідовність якого гомологічна з хромосомним геном стійкості [13], тому було висловлено припущення, що прим-форма плазмиди SRP2 утворилася при ексцизії плазмиди з хромосоми. Загальновідома прим-форма плазмиди *S. coelicolor* SCP1'-*cysB*, яка утворюється в результаті кон'югаційного перенесення [14].

Як встановлено, при секвенуванні з F-праймеру нуклеотидна будова 1,5 тпн PstI-фрагменту стрептоміцетної плазмиди pSS27 гомологічна (до 90 %) з послідовностями генів перенесення ряду плазмід стрептоміцетів: pJV1 (*S. phaeochromogenes*), pSLS (*S. lauterentii*), pSN22 (*S. flavovirens*) та pRL1 (*S. sp.* 44030). Так, гомологічними виявилися нуклеотидні послідовності 1,5 тпн PstI-фрагменту стрептоміцетної плазмиди pSS27 (до 250 пн) генів перенесення *TraBSL* плазмиди pSLS та *TraB* плазмид pJV1 і pRL1 [1, 2]. Виявлено достатню гомологію (55 %) цього фрагменту плазмідної ДНК з послідовністю *spdB1*-гена плазмиди pJV1.

Також нами було виявлено гомологію (до 73 %) сіквенованої з R-праймера стрептоміцет-

ної послідовності pSW49 з послідовностями плазмід pJV1, pSLS і pSN22. Для цієї нуклеотидної послідовності плазмиди pSS27 виявлено гомологію до послідовностей *TraA*-генів вищезначених плазмід [1, 2].

Необхідно підкреслити, що послідовності 1,5 тпн PstI-фрагменту стрептоміцетної плазмиди pSS27, для яких визначено гомологію з плазмідними генами перенесення та хромосомними генами, що детермінують білки, які беруть участь в спороутворенні, є одними і тими ж послідовностями. Однак у джерелах літератури повідомлялося про значну гомологію нуклеотидних послідовностей хромосомних *traA1* і *traB1* генів *S. coelicolor* A3(2) до плазмідних *TraA* і *TraB* генів плазмиди pJV1 (*S. phaeochromogenes*) та послідовності гена *SpoIIIE* *Bacillus subtilis*. Ген *SpoIIIE* детермінує ДНК-трансферазу, необхідну для перенесення хромосоми в проспори протягом третього етапу спороутворення. Водночас як для білків, що кодуються *TraA* і *TraB* генами, декларуються функції міжміцеліального перенесення плазмідної ДНК та формування «поків». Повідомляється про участь білків, детермінованих *traA1* і *traB1* генами в утворенні пор в мембранах клітин *S. coelicolor* [3].

Завдяки новітнім методам досліджень, таким як сіквенс-аналіз, стало можливим визначати ділянки нуклеотидної послідовності хромосом та плазмід, які кодують потенціальні білки. Такі знання надають можливість проводити попереднє генетичне картування як хромосомних, так і плазмідних ДНК.

Таким чином, з великою вірогідністю можна зробити припущення: досліджуваний 1,5 тпн PstI-фрагмент стрептоміцетної плазмиди pSS27 може містити важливі для клітини стрептоміцета гени, які детермінують білки, що беруть участь в спороутворенні чи/та гени, необхідні для поширення самої плазмиди. Планується провести подальші дослідження, які допоможуть визначити функцію, детерміновану даним PstI-фрагментом стрептоміцетної плазмиди pSS27.

1. Інтернет — база даних GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov)
2. Інтернет — база даних EMBL (www.ebi.ac.uk/embl.html)
3. Bentley S. D., Chater K. F., Cerdano-Tarraga A.M., et al. Complete genome sequence of the model actinomycetes *Streptomyces coelicolor* A3(2) // Nature. - 2002. - Vol. 417. - № 6885. - P. 141-147.
4. Huang C., Chen C., Tsai H., Chen C., Lin Y., Chen C. W. Linear plasmid SLP2 of *Streptomyces lividans* is a composite replicon // Mol. Microbiol. - 2003. - Vol. 47. - № 6. - P. 1563-1576.
5. Kataoka M., Kiyose Y. M., Michisui Y., Horiguchi T., Seki T., Yoshida T. Complete nucleotide sequence of the *Streptomyces nigrificiens* plasmid, pSN22: genetic organization and correlation with genetic properties // Plasmid. - 1994. - Vol. 32. - № 1. - P. 55-69.
6. Лук'ячук В. В., Поліщук Л. В., Мацелюх Б. П. Дослідження стрептоміцетної плазмиди pSS27 // Мікроб. журнал. - 2006. - Т. 68. - № 5. - С. 20-25.
7. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli* // Plasmid. - 1984. - Vol. 12. - № 1. - P. 19-36.
8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. - М: Мир, 1984. - 450 с.
9. Поліщук Л. В., Лук'ячук В. В., Стрижкова Г. М. Дослідження властивостей ґрунтових стрептоміцетів // Бюлетень інституту сільськогосподарської мікробіології. - 2000. - № 8. - С. 10-13.

10. Лук'янчук В. В., Стрижкова Г. М., Поліщук Л. В., Конійко О. П., Мацелюх Б. П. Пошук сайтспецифічних ендонуклеаз рестрикції II типу у стрептоміцетів // Мікроб. журнал. - 1998. - Т. 60. - № 4. - С. 20-25.
11. Лук'янчук В. В., Стрижкова Г. М., Поліщук Л. В. Мацелюх Б. П. Нова плазмід pSS27, її рестрикційний аналіз та молекулярна маса // Мікроб. журнал. - 2000. - Т. 62. - № 5. - С. 14-17.
12. Usdin K., Christians K. M., De Wet C., Potgieter T. D., Shaw C. B., Kirby R. The loss of a large DNA fragment is associated with an aerial mycelium negative (Amy) phenotype of *Streptomyces cattleya* // J. General Microbiology. - 1985. - Vol. 131. - № 2. - P. 979-981.
13. Rhodes P. M., Hunter I. S., Friend E. J., Warren M. Recombinant DNA method for the oxytetracycline producer *Streptomyces rimosus* // Biochemical Society Transaction. - 1984. - № 12. - P. 586-587.
14. Hopwood D. A., Wright H. M. Genetic studies on SCP1-prime strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2) // J. Gen. Microbiol. - 1976. - Vol. 95. - № 1. - P. 107-120.

V. Lukyanchuk, L. Polishchuk, B. Matselyukh

INVESTIGATION OF NUCLEOTIDE SEQUENCE OF STREPTOMYCETES PLASMID PSS27

Significant homology of nucleotide sequence of PstI-fragment (1,5 kb) of Streptomyces plasmid pSS27, that maintained in hybrid plasmid pSW49 to chromosomal DNA sequences of S. griseus subsp. griseus NBRC 13350, S. coelicolor A3(2) and S. avermitilis MA-4680 was found. Homology (92 %) of nucleotide sequence of this PstI-fragment of plasmid pSS27 with ones of genes for sporulation protein of Streptomyces coelicolor A3(2) and S. avermitilis MA-4680 chromosomes was determined.

Also it is established homology (73 %) of nucleotide sequence of this 1,5 kb-fragment with sequences of intermycelial plasmid transfer genes of some Streptomyces plasmids (pJV1, pSLS and pSN22).